

CRIBADO ANTIHELMÍNTICO PRIMARIO: SISTEMAS PARA LA EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD NEMATOCIDA *IN VITRO*

MM Martínez Grueiro

Departamento de Parasitología. Facultad de Farmacia.
Universidad Complutense de Madrid. España.

RESUMEN: Los nematodos parásitos causan enfermedades importantes al hombre y a los animales domésticos. El control de estas infecciones se apoya fundamentalmente en el tratamiento con antihelmínticos; lamentablemente, se han ido desarrollando resistencias frente a las distintas clases de antihelmínticos de amplio espectro y existe una clara necesidad de encontrar nuevas alternativas terapéuticas. La investigación farmacológica tiene indudablemente un requerimiento básico: disponibilidad de sistemas de valoración rápidos, sencillos y económicos. En esta revisión examinaremos los métodos que se han propuesto para la evaluación *in vitro* de actividad nematocida. En ellos se utilizan nematodos de vida libre y nematodos parásitos (estadios de vida libre y de vida parasitaria). La actividad se valora determinando el efecto de los productos objeto de estudio sobre el desarrollo, la viabilidad o la motilidad de distintos estadios, o bien a través de parámetros bioquímicos. Estos métodos varían en su sensibilidad, capacidad de selección, rapidez, coste y facilidad de ejecución pero en muchos casos pueden constituirse en sistemas adecuados para la preselección, previa al cribado primario en modelos animales, de antihelmínticos potenciales.

Palabras clave: cribado antihelmíntico, nematocida, «*in vitro*»

PRIMARY ANTHELMINTIC SCREENING: SYSTEMS FOR THE EVALUATION *OF IN VITRO* ANTHELMINTIC ACTIVITY

ABSTRACT: Nematode parasites cause serious infectious diseases in humans and domestic animals. Control of these infections relies mostly on chemotherapeutics, but resistance has developed against most of these broad-spectrum drugs in many parasite species. Discovery and development of new agents effective against the nematodes of major economic or medical importance is necessary now. An important basic requirement for the discovery of chemotherapeutic drugs is the testing facilities. In this paper, *in vitro* techniques used for the detection and measurement of anthelmintic activity are reviewed. The primary systems employed for this purpose utilize free-living nematodes and free-living and parasitic stages of parasitic nematodes. Interpretation of nematocidal activity in these assays commonly relied on the detection of drug-induced effects on nematode development, viability, motility or biochemical parameters. Such screens vary in their sensitivity, selectively, cost, rapidity and ease of execution, but afford useful and economical means for the initial selection of new compounds for further more detailed evaluation in animal models.

Key Word: antihelmintic screening, nematocide, “*in vitro*”

Fecha de recepción: 07/03/02

Fecha de aprobación: 05/04/02

Dirección para correspondencia: Martínez Grueiro, M.M. Departamento de Parasitología. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid. España.

E-mail: mgrueiro@farm.ucm.es

INTRODUCCIÓN

La búsqueda de nuevas alternativas para el tratamiento de las helmintosis que afectan al hombre y a los animales domésticos puede plantearse hoy desde nuevas perspectivas (1, 2, 3), pero la mayor parte de los antiparasitarios actuales tuvieron su origen en el cribado empírico masivo de productos de síntesis o de origen natural, y en la explotación racional de sus resultados. Esta vía ha sido y sigue siendo uno de los caminos fundamentales para la búsqueda de nuevos medicamentos, pero sólo será viable si se dispone de sistemas de ensayo simples y económicos que permitan valorar un gran número de compuestos, operando con cantidades mínimas de producto, y que nos ofrezcan la mayor sensibilidad y especificidad posible. Los sistemas *in vitro* tratan de responder a esta necesidad; sus limitaciones son obvias pero sus ventajas nada desdeñables, y por ello se convierten habitualmente en el primer paso de lo que, en el mejor de los casos, será una larga serie de pruebas que nos conducirá a un nuevo agente terapéutico.

En esta revisión examinaremos los distintos sistemas que se han propuesto para la valoración *in vitro* de actividad nematocida (o para la detección de antihelmínticos de amplio espectro), entendiendo que estas pruebas constituyen el primer nivel de cribado y que los productos que lo superen serán sujeto siempre de ensayos *in vivo* (cribado primario *in vivo*). Las pruebas *in vitro* se realizan con nematodos de vida libre y nematodos parásitos; los primeros pretenden ser, en palabras de Tiner (4), un "simulador aceptable" del parásito *in vitro*. Entre los segundos se incluyen especies "diana", parásitos del hombre o de los animales que constituyen el objetivo final de los potenciales antiparasitarios, y especies próximas, parásitos propios de los animales de experimentación más económicos, cuyos ciclos biológicos pueden mantenerse en el laboratorio.

NEMATODOS DE VIDA LIBRE

El uso de nematodos de vida libre en ensayos farmacológicos es muy antiguo y coexiste en sus orígenes con el de otros organismos no parásitos o ectoparásitos, tales como oligoquetos o hirudíneos (5); estos últimos pronto serán desestimados pues están muy lejos de poder representar a las especies que se desea combatir. Los nematodos de vida libre, sin embargo, seguirán utilizándose hasta nuestros días. La facilidad de su cultivo, ya sea en condiciones monoxénicas o axénicas, y sus cortos ciclos biológicos, posibilitan la obtención de un gran número de individuos; so-

bre ellos o sobre su desarrollo se evaluará la actividad nematocida. El valor de estos sistemas como indicadores de actividad antiparasitaria es discutible, pero persisten como métodos sensibles, sencillos, rápidos y económicos para la preselección de antihelmínticos o nematocidas potenciales.

Una de las primeras especies utilizadas fue *Rhabditis pseudoelongata* (syn. *Rhabditis macrocerca*), un rhabdítico saprozoico que se aísla de heces de conejos silvestres (6, 7, 8, 9). Tras los primeros trabajos publicados, y a la vista de la escasa sensibilidad del modelo, se abandonó su uso; no obstante, en 1981 es utilizado de nuevo por Brienne *et al.* (10) para la valoración de una serie de compuestos análogos al tetramisol. Las experiencias de estos investigadores ponen de manifiesto la gran sensibilidad de *R. pseudoelongata* al levamisol y tetramisol; su concentración letal 50 (CL₅₀) se estimó en 0,25 y 0,4-0,5 µg/ml respectivamente. La respuesta ante otros antihelmínticos no es tan satisfactoria; tiabendazol y befenio presentan una CL₅₀ de 50 µg/ml, mebendazol 100 µg/ml y flubendazol, piperacina y pirvinio superiores a 100 µg/ml. Este modelo sería nuevamente utilizado por investigadores franceses para valorar productos de síntesis análogos al levamisol (11, 12), derivados amidínicos azolados (13) y arsenicales trivalentes (14). El procedimiento, en líneas generales, consiste en incubar los nematodos (larvas y adultos), durante 2 horas (a veces 24 horas), en oscuridad, a 25-27 °C, en la presencia de los compuestos objeto de estudio; al cabo de este tiempo se determina el porcentaje de mortalidad para cada concentración ensayada y se calcula la CL₅₀.

Otras especies como *Rhabditis strongyloides* (4, 15), *Rhabditis pellio* (4), *Acroboloides obtusicaudatus* (16), *Rhabditis oxycerca* (17, 18) y *Panagrellus redivivus* (17, 18, 19), también se han empleado ocasionalmente en la valoración de actividad nematocida.

En 1952 se propuso la utilización de *Turbatrix aceti*, "la anguila del vinagre", como modelo experimental para el cribado antihelmíntico (20); en la literatura hemos encontrado muy pocas referencias a su uso (21, 22). Vanfleteren y Roets (23) determinaron el efecto de algunos antihelmínticos sobre el crecimiento de poblaciones de *T. aceti* y *Caenorhabditis briggsae* en cultivo axénico. Según estos autores, ascaridol, befenio, d-tubocurarina y piperacina no afectan a estos nematodos; fenotiacina y hexilresorcinol inducen una inhibición moderada, y pirvinio, ditiазanina y tiabendazol son muy eficaces. *C. briggsae* ya

había sido utilizado en los años 50 y 60; habiéndose observado mayor sensibilidad al valorar el efecto sobre el crecimiento de la población (24). En 1965, Tiner (4) afirmó que *C. briggsae*, al igual que *Rhabditis strongyloides* y *Rhabditis pellio*, no constituían sistemas válidos para estudiar actividad nematocida, pues estos nematodos crecían y se reproducían en presencia de fenotiacina. Con *C. briggsae*, Fiakpiu (25) estudió el mecanismo de acción de la piperacina.

Entre los nematodos de vida libre, utilizados en estudios de quimioterapia experimental, ocupa un lugar privilegiado *Caenorhabditis elegans*. Este pequeño nematodo, cuyo hábitat natural es el suelo (vive en la fina película de agua que rodea las partículas de tierra), posee una serie de atributos (anatomía muy simple, corto ciclo biológico, facilidad de cultivo, pequeño genoma, etc) que lo convierten en un excelente modelo experimental para el estudio de diversos problemas biológicos. En este contexto, su utilización en estudios farmacológicos es sólo una de sus múltiples facetas y no la de mayor relevancia. Son Platzer, Eby y Friedman (26) quienes proponen su uso como modelo para la búsqueda de nuevos antihelmínticos y para el estudio del mecanismo de acción de los derivados bencimidazólicos, tras comprobar que los bencimidazoles (mebendazol, cambendazol, oxibendazol, parabendazol, fenbendazol y tiabendazol) inhiben su crecimiento. Simpkin y Coles (27) sistematizan el uso de *C. elegans* como modelo de cribado; establecen un método y determinan la sensibilidad de este nematodo a distintos antihelmínticos, así como su capacidad de selección en el cribado. Las pruebas se realizan en placas de 24 pocillos; los vermes (10-20/pocillo) procedentes de un cultivo de 4-8 días se incuban a 20 °C, durante 7 días en presencia de los fármacos. El medio de cultivo se compone de un tampón, un cultivo de *Escherichia coli*, ampicilina y nistatina (la ampicilina inhibe la multiplicación bacteriana, reduciendo las probabilidades de que los productos a valorar sean metabolizados). Transcurrido el periodo de incubación se procede a la observación y comparación de los pocillos con y sin fármaco (n=2). Se distinguen dos grupos de vermes, inmaduros y portadores de huevos. La dosis activa mínima detectable (DMD) se define como la dosis más baja, activa en uno de los grupos o dudosa en los dos, según el siguiente baremo:

- Activo: presencia de un número de vermes igual o inferior al inicial
- Dudoso: población ligeramente superior
- Inactivo: gran incremento en el número de vermes

El modelo reconoce la actividad de todos los antihelmínticos de amplio espectro y es especialmente sensible a la avermectina B1a.

Haber *et al.* (28), Conder *et al.* (29) y Dutton *et al.* (30) utilizan el método de Simpkin y Coles (27); en el primero de estos trabajos, la eficacia se valora, por observación microscópica, asignando valores de 0 a 5 en función del número de supervivientes (5, ninguno; 4, de 1 a 5; 3, de 6 a 10; 2, de 11 a 20; 1, de 21 a 50, 0 >50).

En nuestro laboratorio, *C. elegans* se mantiene desde 1983, mediante resiembras sucesivas y criopreservación en nitrógeno líquido. Siguiendo los métodos descritos por Brenner (31), los nematodos se cultivan a 20±1 °C, en placas de Petri sobre agar NG ("nematode growth") previamente sembrado con *E. coli* (cepa OP50, deficiente en uracilo). Para el cribado primario hemos utilizado el sistema descrito por Simpkin y Coles (27) con algunas modificaciones (32); básicamente, se determina el efecto de los productos, sobre el desarrollo y la capacidad reproductiva, cuantificando los niveles de población alcanzados, a partir de un pequeño número de vermes en el mismo estado de desarrollo, en los pocillos testigo y problema (n=8), tras los siete días de incubación, y estableciendo los correspondientes porcentajes de reducción. La primera modificación supone la utilización de una población sincrónica, larvas de segundo o tercer estadio que se obtienen siguiendo el método de Hirsh, Oppenheim y Klass (33). La segunda modificación -la sustitución de la observación directa por el recuento en cámara McMaster- fue también realizada por Coles (34) y otros autores, si bien, coincidimos con Coles (35) en que puede prescindirse de ella, si se desea afrontar el cribado de un gran número de compuestos.

C. elegans es muy sensible a los derivados bencimidazólicos, aunque los huevos de este nematodo parecen ser menos sensibles que los de los nematodos parásitos (36). En nuestros ensayos, al realizar el examen microscópico de las poblaciones expuestas a estos fármacos (durante el proceso de recuento), observamos que las larvas más jóvenes exhibían su motilidad característica mientras que los últimos estados larvarios y especialmente los adultos no se movían y cuando lo hacían era de forma espasmódica e irregular (37). Spence *et al.* (38), autores de un detallado estudio que recoge los efectos del mebendazol, sobre el crecimiento, desarrollo y capacidad reproductiva de *C. elegans*, registraron un comportamiento similar: el movimiento de las L₁ y L₂, cultivadas en

presencia de mebendazol (6,25 µg/ml), era normal; la parálisis comenzaba a evidenciarse en el estadio de L₃ y era severa desde el estadio de L₄. Recientemente también se ha señalado que las L₁ de *C. elegans* son menos sensibles a la inmovilización por clorpromacina que los adultos (39).

Simpkin y Coles (27) recomendaron que el cribado de nuevos compuestos se iniciase con dosis de 50 µg/ml. Ellos valoraron 445 compuestos, ensayados previamente en ratón; entre los productos que el sistema reconoció como activos (62), se encontraban todos los que habían mostrado actividad *in vivo* sobre nematodos. No detectaron por tanto "falsos negativos", pero cabe suponer que si obtuvieron "falsos positivos". Se ha estimado que el 10 % de los productos valorados en este sistema (50 µg/ml) resultan activos (40, 41); Jenkins (40) considera que esto supone un nivel de preselección aceptable, aunque critica el modelo por su escasa sensibilidad al pirantel (DMD 50 µg/ml) y al tiofanato (DMD 250 µg/ml). La capacidad de selección de *C. elegans* no es obviamente la ideal, al igual que los demás sistemas *in vitro* será sensible a compuestos con actividad biocida (35) pero, como señala Coles (42), su bajo coste y el hecho de que no requiere animales de experimentación probablemente justifican su uso continuado como sistema de preselección, previo al cribado primario *in vivo*.

Nosotros habitualmente iniciamos el cribado, en el caso de productos de síntesis, con concentraciones de 100 µg/ml; si 50 µg/ml representa el límite de eficacia de un antihelmíntico como pirantel nos pareció preferible partir de una concentración mayor, aunque no mucho mayor puesto que esto incrementaría el número de falsos positivos ya de por sí elevado. Por otra parte, observamos que el pirantel a 25 µg/ml no afecta a la capacidad reproductiva de los vermes pero sí reduce considerablemente su motilidad. Este hecho nos sugirió la conveniencia de tener en cuenta, a la hora de evaluar nuevos compuestos, su repercusión sobre la motilidad (37); al menos en una ocasión, nos hemos encontrado ante un producto que redujo la motilidad sin inhibir apenas el crecimiento de la población y que mostró posteriormente actividad nematocida *in vivo* (43).

La motilidad se ha empleado como criterio único de valoración en ensayos más simples realizados con *C. elegans*. Básicamente, en estas pruebas ("motility assays"), los nematodos recogidos de las placas de cultivo, tras varios lavados, se ponen en contacto con los productos (en tubos o placas, en el tampón de lavado) durante 2, 16, 18

ó 24 horas. Finalmente, se examinan al microscopio y se determinan las concentraciones que inmovilizan al 50, 90 o 95 % de los vermes (44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51 y 52, entre otros). En un trabajo reciente se utilizan el método de cultivo de 7 días (27) y el de motilidad de 2 horas (46), observándose, como cabía esperar, que el primero es más sensible (53).

C. elegans es también un modelo experimental útil en estudios toxicológicos; en este campo, se han utilizado distintos criterios de valoración, fundamentalmente letalidad (54), reproducción (55) y "comportamiento" (56, 57). Este último parámetro, evaluado a través de un sistema informatizado de análisis de imágenes, no se ha probado todavía con un rango amplio de productos, pero los resultados obtenidos hasta el momento denotan una gran sensibilidad, equiparable a la que ofrece la valoración de la capacidad reproductiva. Evidentemente, este sistema exige unos recursos técnicos considerables, pero el software ya ha sido desarrollado, y podría suponer una alternativa muy satisfactoria para la evaluación de actividad antihelmíntica.

Una variante un tanto particular de los sistemas desarrollados con *C. elegans* para detectar actividad nematocida la constituye el denominado "water agar assay", diseñado específicamente para detectar hongos capaces de destruir nematodos (48). En él, pequeñas piezas de agar (10 mm Ø) de los cultivos del hongo y del nematodo se colocan en posiciones opuestas sobre placas de agar-agua. Las placas se examinan diariamente; a los 3-7 días, aquellos hongos que manifiestan efectos nematocidas (muchos nematodos inmóviles o muertos en las proximidades del micelio) se seleccionan para estudios posteriores. Mayer, Anke y Sterner (58) en lugar de una porción del medio con nematodos colocan, en la misma posición, una suspensión de larvas (1000 larvas/200 µl). En este último trabajo, y en otros que se han mencionado, el cribado está orientado hacia la búsqueda de productos activos frente a nematodos parásitos de plantas.

Las posibilidades de *C. elegans* como modelo experimental, en el campo de la quimioterapia antihelmíntica, no se restringen a su utilización como sistema de cribado, también es un organismo apto para el estudio de los mecanismos de acción y de resistencia; la bibliografía en esta área es muy extensa e inabordable en esta revisión.

Una de las propuestas más recientes, en relación al uso de nematodos de vida libre como

sistemas de cribado primario, se debe a Yanagida *et al.* (59). Estos investigadores aislaron los nematodos del suelo del Campus de la Universidad de Toho (Japón); fueron identificados como miembros de la Clase Secernentea, Orden Rhabditida, Familia Diplogastridae. Yanagida *et al.* (59), tras establecer las condiciones para su cultivo, desarrollaron un sistema para valorar actividad nematocida. En sus pruebas, las larvas de tercer estadio se incuban a 28 °C, durante 4 horas, con y sin los productos objeto de estudio, y tras este periodo se determinan los porcentajes de letalidad y se calcula la concentración mínima letal. Se trata además de correlacionar la forma que adoptan las larvas con el mecanismo de acción de los fármacos de referencia. Las concentraciones mínimas letales de algunos de los antiparasitarios probados son las siguientes: levamisol 8 µM, metrifonato 16 µM, avermectina 150 µM, citrato de piperacina 630 µM, albendazol 310 µM, tiabendazol 200 µM, clorhidrato de quinina 310 µM, pamoato de pirantel > 100 µM, dietilcarbamacina 30 mM. Este método se ha utilizado para valorar la actividad nematocida de 22 picrodendrinas (60) y 38 quasinoídes (61), y para realizar los correspondientes estudios de relación estructura-actividad. No disponemos de datos sobre la actividad *in vivo* de estos compuestos.

Finalmente, en este apartado incluiremos una última especie muy diferente a las anteriores, ya que no es un organismo de vida libre sino un fitoparásito, nos referimos a *Bursaphelenchus xylophilus* (*syn. B. lignicolus*); su inclusión se justifica por el hecho de que su ciclo biológico, al igual que el de los nematodos de vida libre, se mantiene íntegramente *in vitro*. Este nematodo (*Aphelenchida*) es parásito de coníferas y produce una enfermedad muy grave en los árboles; su valor potencial como modelo experimental se ve por tanto incrementado al tratarse de una especie patógena y consecuentemente "diana" *per se* de los hipotéticos agentes farmacológicos que puedan seleccionarse con él.

En el laboratorio, *B. xylophilus* crece sobre cultivos de *Botrytis cinerea* en agar Czapek-Dox o patata-glucosada. Se han descrito distintos procedimientos para la valoración de actividad nematocida; Kimura *et al.* (62) y Otoguro *et al.* (63) evalúan el efecto paralizante o letal de los compuestos, determinando la capacidad de los nematodos para atravesar papel japonés (papel para escribir tipo Kokuyo, Tai-19). En el último trabajo citado, los nematodos se mantienen en contacto con los productos durante 18 horas, en pequeños tubos de vidrio, tapados con el papel japonés. Al

cabo de este tiempo, los tubos se invierten sobre los pocillos de una placa de 24 pocillos en los que se ha dispuesto una solución de estreptomina. Tras una incubación adicional de 3 horas a 27 °C, se examinan los pocillos a fin de estimar la mortalidad, aplicando la siguiente ecuación: mortalidad (%) = {1 - [A + (B x 0,5) + (C x 0,25) / D]} x 100, donde A, B, y C son el número de gusanos que exhiben una motilidad normal, moderada o escasa respectivamente, y D es el número de gusanos vivos en el control. En estas condiciones, la CI₅₀ de la avermectina B1a es 0,1 µg/ml.

Alen *et al.* (64, 65) siguen el método de Kawazu *et al.* (66) con algunas modificaciones. En una placa de Petri (4 cm Ø), en la que se ha cultivado el hongo (a 21 °C durante 4 días), se coloca una bolita de algodón (5 mm Ø) con el producto a ensayar (máximo 20 mg); en el algodón se inyecta la suspensión de nematodos (0,1 ml/1500 vermes) y la placa se incuba a 26 °C, 4 días. Si los nematodos no consumen el micelio, el producto se considera activo; en caso contrario, inactivo. La dosis mínima eficaz será la dosis menor que inhibe el consumo del micelio.

Otros investigadores trabajan con dos especies de *Bursaphelenchus*: *B. xylophilus* y *B. mucronatus*; sobre ambas se determina el efecto paralizante o letal de los productos, tras 24 horas de incubación a 25 °C, por observación visual (si permanecen inmóviles y no responden al contacto se consideran muertos). Con la primera especie, también se realizan pruebas de comportamiento que nos recuerdan los antibiogramas clásicos. En el centro de una placa de Petri, con agar, se dispone una gota de una suspensión de L₄ y adultos (40 µl/10.000 vermes); cuando se seca, se colocan a su alrededor (equidistantes del centro y del margen de la placa) 4 discos de papel de filtro a los que se incorporó previamente el producto en estudio (en uno de ellos el disolvente). Tras 0,5, 1 ó 2 horas a temperatura ambiente, se examinan las placas para observar si se produce un efecto "tóxico" -nematodos muertos o inmóviles alrededor del disco- o "repelente" - los nematodos se distribuyen por toda la placa, salvo en los márgenes del disco (52).

NEMATODOS PARÁSITOS

Los nematodos parásitos, especialmente aquellos que son el objetivo final de la quimioterapia, representan *a priori* el sistema más adecuado para la evaluación *in vitro* de actividad nematocida; sin embargo, la especificidad de hospedador de muchas de estas especies hace imposible o difícil su utilización, ya que no pueden mantenerse

en animales de experimentación o requieren hospedadores muy costosos. Por otra parte, ninguno de ellos puede cultivarse íntegramente *in vitro*. Estos problemas han determinado el uso alternativo de especies propias de los animales de laboratorio, particularmente de los más económicos, el ratón y la rata.

Para la valoración de actividad antihelmíntica se han utilizado muy a menudo los estadios de vida libre de los nematodos parásitos, especialmente del Orden Strongylida. Las razones son obvias; el desarrollo de estos estadios *in vitro* es fácil (no ocurre así con los estadios parásitos) y, además, pueden obtenerse en número elevado, sin necesidad de sacrificar a sus hospedadores. Estos sistemas aportan una gran economía de medios y, en general, niveles de sensibilidad aceptables; en su contra, cabe decir que, al igual que los modelos desarrollados con nematodos de vida libre, seleccionan una mayor proporción de falsos positivos que los sistemas que emplean estadios de vida parasitaria.

Entre los primeros trabajos publicados, se encuentran los realizados por Shorb y Habermann (67), con larvas de tricostrongílidos de oveja, Levine (68), con larvas de estrongílidos de caballo, Deschiens (69), con larvas de *Haemonchus contortus*, Tiner (70), con los estadios de vida libre de *Obeliscooides cuniculi* y *Trichostrongylus calcaratus*, Leland y Bogue (71), con huevos y larvas de *Strongyloides ransomi*, y Parnell (72), con larvas de estrongílidos y tricostrongílidos. El examen de estos primeros trabajos y de los publicados posteriormente nos muestra que los esfuerzos se han orientado en tres direcciones; básicamente, se ha tratado de determinar el efecto de los compuestos objeto de estudio sobre el desarrollo de los huevos (embrionamiento y eclosión), sobre determinados estadios larvarios o sobre el desarrollo desde huevo a larva de tercer estadio (L₃).

La actividad ovicida de los bencimidazoles es bien conocida (73, 74, 75) y las pruebas que evalúan el efecto de estos fármacos sobre el desarrollo de los huevos (76, 77, 78, 79) se contemplan fundamentalmente como sistemas para la valoración *in vitro* de la resistencia a estos antihelmínticos. La resistencia al levamisol también se estima de modo similar, basándose en la capacidad de este fármaco para inhibir la eclosión (80). El valor de estas pruebas como sistemas de preselección de antihelmínticos potenciales es muy limitado; los ensayos realizados con fármacos de referencia denotan un espectro de sensibilidad

muy reducido. Coles y McNeillie (81) estudiaron el efecto de varios antihelmínticos sobre el desarrollo de los huevos de *Nematodirus spathiger*. Los huevos se incuban en presencia del producto, durante 3 días a 27 °C, y se determina el porcentaje de embrionamiento. Los bencimidazoles (tiabendazol, cambendazol, parabendazol, oxiabendazol, albendazol, mebendazol y febendazol) muestran una gran actividad, apreciable a concentraciones de 0,5 p.p.m. ; por el contrario, tetramisol, levamisol, pirantel, morantel, pamoato de pirvinio, yoduro de estilbacio y tiofanato no inhiben el embrionamiento de los huevos. El cribado de 2.000 compuestos, elegidos al azar, proporcionó relativamente pocos "activos" (63 compuestos). Nosotros hemos determinado el efecto de 14 antihelmínticos sobre el desarrollo de los huevos de *Heligmosomoides polygyrus* (a 20 °C embrionan en 24 horas y eclosionan a las 40 horas de incubación). Observamos que sólo los bencimidazoles (y no todos ellos) inhiben el embrionamiento y la eclosión, mientras que el levamisol tan solo inhibe la eclosión; otros antihelmínticos de amplio espectro tan relevantes como la ivermectina no muestran actividad (82). A pesar de ello, entendemos que estas pruebas, rápidas y sencillas, pueden complementar otros estudios *in vitro* y ofrecer información adicional; nosotros las hemos utilizado ocasionalmente, con otros modelos, en la valoración de actividad nematocida (83, 84).

Otros autores utilizan en sus ensayos un estado larvario determinado, muy a menudo L₃ de tricostrongiloideos; éstas ofrecen una ventaja adicional, sobre otros estadios de vida libre, que es la posibilidad de conservación durante periodos de tiempo prolongados. Schulz, en 1974 (85), comunicó que compuestos con actividad antihelmíntica reconocida no afectaban a las larvas de *Oesophagostomum* sp. *in vitro*, indicando que este modelo no era apto para las pruebas de cribado. Boisvenue *et al.* (86) valoran la actividad de 25 antihelmínticos frente a L₃ desenvainadas de *Haemonchus contortus*. El criterio de actividad aplicado es la pérdida de motilidad o muerte de las larvas, tras su incubación durante 24 horas con el fármaco. La subjetividad de la interpretación es minimizada, según estos autores, por la gran motilidad que caracteriza a estas larvas y por el hecho de que las observaciones las realiza siempre la misma persona. El sistema es particularmente sensible a la ivermectina y al levamisol, pero otros antihelmínticos, entre ellos los bencimidazoles, se muestran inactivos. Boisvenue *et al.* criban un total de 5.280 compuestos; aproximadamente, un 5% denotan actividad a la concentración de 100 µg/ml (86).

La evaluación de actividad antihelmíntica a través de la apreciación visual directa, por un observador, de motilidad o viabilidad ha sido criticada por su dificultad y subjetividad, pero es uno de los criterios de uso más generalizado. Lo emplean, por ejemplo, Hood *et al.* (87) y Blanchflower *et al.* (88) en las pruebas *in vitro* con L₃ de *H. contortus* para el estudio de una nueva serie de milbemicinas, y de paraherquamida y otros metabolitos de *Penicillium sp.*, respectivamente. Estos ensayos se realizan en placas de microtitulación, en cuyos pocillos se disponen los extractos disueltos en metanol hasta su evaporación. Se añaden a continuación las larvas y, tras una noche de incubación a 4 °C, las placas se dejan a temperatura ambiente y se examina, visualmente, la motilidad de las larvas. Del mismo modo se actúa en el sistema desarrollado por Gill *et al.* (89), con L₃ de *H. contortus*, *Trichostrongylus colubriformis*, y *Ostertagia circumcincta*, para la valoración de resistencias y que se ha utilizado en la evaluación de antihelmínticos potenciales, paraherquamida (90) y bafilolidas (91) entre otros. En él, las L₃ se disponen en los pocillos de una placa (placas de 96 pocillos) en los que se ha colocado el producto en solución y una matriz de agar al 2 %. Las placas se mantienen a 25 °C, en oscuridad, y se exponen a la luz durante 20 minutos cada 24 horas para inducir la motilidad. A las 72 horas, se determina visualmente el número de larvas móviles (se consideran como tales sólo aquellas que muestran el movimiento sinusoidal normal) y no móviles, y se calcula la concentración requerida para paralizar al 50 % de las larvas.

Los intentos de objetivar la valoración del efecto de los fármacos sobre la motilidad de las larvas pasan por el uso de fotodetectores (sistemas automatizados de medida) y el desarrollo de sistemas que evalúan la capacidad migratoria de las larvas. Bennett y Pax (92) diseñaron un instrumento (Micromotility Meter™, B&P Instruments, Mason, USA) para cuantificar la motilidad de larvas y adultos, de nematodos parásitos o de vida libre. Con este aparato se ha evaluado el efecto de distintos antihelmínticos sobre L₃ envainadas de *H. contortus* (93, 94), *T. colubriformis* (95) y *Strongylus edentatus* (96). En estas condiciones la sensibilidad de los modelos se incrementa significativamente; en las experiencias de Boisvenue *et al.* (86), antes mencionadas, el albendazol (100 µg/ml) no producía efectos apreciables sobre la motilidad de las larvas de *H. contortus*; Folz *et al.* (93, 94), con el nuevo sistema, registran reducciones del 58 % y 91 % en el índice de motilidad. La mayor sensibilidad del sistema automatizado también se evidencia en la respuesta ante otros fár-

macos cuyos efectos son evidentes en observación directa; Geary *et al.* (97) señalaron que las concentraciones de ivermectina requeridas para afectar a la motilidad de adultos de *H. contortus* ($\geq 10^{-8}$ M) eran mucho más bajas que las necesarias para apreciar pérdida de motilidad visualmente (10^{-6} M).

La capacidad migratoria de las larvas -medida de su motilidad-, tras la exposición a sustancias con potencial actividad antiparasitaria, se puede estimar mediante el uso de geles de agar (98, 99) o de pequeños tamices de nylon (100, 101). En el primer caso, las larvas se ponen en contacto con el producto a valorar, y tras 2 ó 3 horas de incubación a 37 °C se incorpora al tubo agar (1,4%) a 45 °C; la mezcla se coloca en un tamiz que se sitúa sobre una pequeña placa de Petri que contiene el producto en estudio a la misma concentración. Tras un nuevo periodo de incubación, 16 horas o más, ahora a temperatura ambiente, los tamices se retiran y se cuenta el número de larvas que han abandonado el gel de agar. En los ensayos realizados con larvas desenvainadas de *T. colubriformis*, ivermectina, levamisol y morantel, a concentraciones entre 1 y 10 µg/ml, y tiabendazol, a concentraciones superiores a 10 µg/ml, inhiben la migración. Con este sistema, Douch y Morum (99) determinaron la CE₅₀ (concentración requerida para inhibir al 50 % de las larvas) del levamisol frente a L₃ envainadas y desenvainadas de siete especies de trichostrongílidos de oveja, observando sólo diferencias significativas entre el uso de unas u otras en el caso de *N. spathiger*. En este sentido, tal vez convenga señalar que se han observado diferencias acusadas entre el efecto del levamisol y la ivermectina sobre la motilidad de larvas envainadas y desenvainadas de *H. contortus*, siendo estas últimas menos sensibles; si esto se debe a la presencia de la vaina o al tratamiento que se aplica para desenvainarlas no se ha elucidado (39), pero como indican Conder y Johnson (103), cuando se realizan estudios *in vitro* con larvas desenvainadas, debe tenerse en cuenta que los procedimientos de desenvainamiento pueden afectar a la viabilidad de las larvas.

Wagland *et al.* (100) y Rabel, McGregor y Douch (101) valoran la motilidad de las larvas determinando su capacidad para atravesar pequeños tamices de nylon con luz de malla adecuada (tubos de vidrio o plástico en cuyo extremo se dispone una malla de nylon; la abertura de malla se elige a tenor del tamaño de la larva). Las larvas se incuban con el producto objeto de estudio durante 2 horas y a continuación se transfieren (con la solución en la que se encuentran) a los tamices

que se han colocado en los pocillos de una placa de cultivo (placas de 48 pocillos). Tras 14-16 horas de incubación, los tamices se retiran, se añade lugol a los pocillos y se cuentan las larvas (la lectura, si se desea, puede diferirse). Las pruebas realizadas con L₃ desenvainadas de *T. colubriformis* revelan que ivermectina, levamisol, morantel y piperacina inhiben la migración larvaria, mientras que el tiabendazol tiene un efecto mínimo a concentraciones inferiores a 100 µg/ml. Este sistema ha sido utilizado por Molan *et al.* (104, 105, 106) para valorar el efecto de taninos condensados y lactonas, extraídos de distintos forrajes, sobre L₁ y L₃ de *Dictyocaulus viviparus*, y L₃ de *Ostertagia*, *Oesophagostomum*, *Cooperia*, *Trichostrongylus* y *Strongyloides*.

Algunos autores sostienen que la viabilidad de las larvas infectantes tratadas *in vitro* debe estimarse a través de la inoculación a hospedadores sensibles o bien mediante un sistema de cultivo, capaz de soportar el desarrollo de los estados parasitarios (107). La primera vía supone la utilización de animales de laboratorio, al igual que en una prueba *in vivo*, pero preserva una de las ventajas más destacable de los sistemas *in vitro*, que es la posibilidad de operar con cantidades muy pequeñas de producto, puesto que el tratamiento se realiza *in vitro*. Bhopale y Bhatnagar (108) evaluaron el efecto de diversos antihelmínticos sobre la capacidad infectante de L₃ de *Ancylostoma caninum* (inoculación a ratón); los derivados bencimidazólicos no mostraron actividad larvicida. Nuestra experiencia en este contexto se limita al uso de L₃ de *H. polygyrus*; cuando éstas se incuban durante 4 días a temperatura ambiente en presencia de tiabendazol, parbendazol o mebendazol (100 µg/ml), su capacidad infectante se reduce en un 40 %, 38 % y 0, respectivamente. Por el contrario, el tratamiento con pirantel, levamisol o ivermectina (concentraciones iguales o inferiores a 1 µg/ml) reduce drásticamente su viabilidad (109).

En general, y tal como hemos ido viendo, los sistemas desarrollados con larvas de tercer estadio de trichostrongiloideos pecan de escasa o nula sensibilidad a los bencimidazoles; aunque sí parecen representar muy satisfactoriamente una de las dianas (o conjunto de dianas) más importantes de la quimioterapia antihelmíntica, el sistema nervioso o la coordinación neuromuscular. De este marco general, habría que excluir el sistema desarrollado por Bories *et al.* (110) con larvas infectantes de *Nippostrongylus brasiliensis*, que es muy sensible a los derivados bencimidazólicos. En este caso, las L₃ se incuban en condiciones axénicas,

en medio RPMI con suero fetal (10 %) y antibióticos, a 37 °C y en una atmósfera con un 10 % de CO₂. Las larvas se mantienen en contacto con los productos objeto de estudio durante 24/96 horas y se examina, tras estos periodos, su motilidad. La CE₅₀ (concentración que paraliza al 50 % de las larvas), a las 96 horas, de albendazol, mebendazol, flubendazol y tiabendazol es inferior a 0,04 µM. El modelo es comparativamente menos sensible a los antihelmínticos de amplio espectro que actúan a nivel neuromuscular, levamisol (CE₅₀ 0,07 µM), ivermectina (CE₅₀ 0,22 µM) y morantel (CE₅₀ 3,98 µM). Este método ha sido reiteradamente utilizado por investigadores franceses, en la evaluación de la actividad antiparasitaria de nuevos productos de síntesis (11, 14, 111, 112, 113).

Otros investigadores, interesados fundamentalmente en la búsqueda de nuevas alternativas para el tratamiento de las nematodosis tisulares, han optado por el uso de las larvas de segundo estadio (L₂) de *Toxocara canis*. En sus primeros trabajos (114, 115, 116), el efecto de los productos sobre las larvas se valora visualmente, a través de la aplicación de un baremo que puntúa su estado de 0 (larva muerta) a 3 (la larva mueve todo el cuerpo); se calculan unos "índice de motilidad" y la "motilidad relativa" (relación entre los índices de motilidad de larvas testigo y tratadas). Posteriormente, ante la dificultad de determinar si las larvas están vivas o muertas, realizan una prueba adicional, una tinción con violeta de genciana para estimar la viabilidad larvaria (117, 118). Cualquiera de estos procedimientos es laborioso al exigir el examen microscópico de las larvas. Finalmente, recurrirán a un método colorimétrico basado en la reducción de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio), y consiguiente producción de cristales de formazán que se correlaciona linealmente con el número de larvas vivas. Los cristales se disuelven en DMSO (dimetilsulfóxido), sin o con un tampón glicina pH 10,5, y la absorbancia de la solución resultante se mide a 540 nm; comparando las absorbancias correspondientes a larvas testigo y tratadas (porcentajes de reducción) se establecen los "índices de citotoxicidad" (119). El sistema, según sus autores, es adecuado para medir actividad larvicida aunque requiere un número mayor de larvas que los métodos anteriores; previamente se había empleado para valorar la viabilidad de otros nematodos - filarias - (120, 121, 122, 123, 124), un grupo muy peculiar que no se contempla en esta revisión.

Las L₂ de *Ascaris suum* también se han utilizado para la valoración *in vitro* de actividad anti-

helmíntica. Grunberg y Cleeland (125) las incuban en medio 199, a 37 °C durante 3 días, en presencia de algunos antihelmínticos de los que determinan la concentración mínima letal (motilidad como criterio de viabilidad); la del tiabendazol se estima superior a 10 mg/ml. Un modelo mucho más sensible será propuesto posteriormente por Rew, Urban y Douvres (126). Las L₂ de *A. suum* se cultivan en condiciones que permiten su desarrollo hasta L₃ "jóvenes" (10 días), y se determina el efecto de los fármacos sobre su supervivencia, motilidad y muda. El tiabendazol y otros antihelmínticos se muestran activos a la concentración de 0,01 µg/ml. Los autores, sin embargo, consideran que su prueba puede ser poco selectiva; los isómeros D y L del tetramisol, y el albendazol y su sulfona, denotan en ella la misma actividad.

Entre los modelos desarrollados con los estadios de vida libre de los nematodos parásitos, aquellos que determinan el efecto de los productos sobre el desarrollo desde huevo a L₃ son los que muestran un espectro de sensibilidad más amplio. Tiner (70) empleó los estadios de vida libre de *O. cuniculi* y *T. calcaratus*. Los huevos, aislados de heces de conejos infectados, se incubaban en agua con *Escherichia coli* y en presencia del producto a valorar, y se determinaba si éste afectaba a los huevos o a las larvas; si era inactivo, se producía la eclosión de los huevos y el desarrollo de las larvas hasta el estadio infectante. Como señala Jenkins (40), el valor de esta prueba es difícil de determinar porque se evaluaron muy pocos compuestos; lo mismo sucede con otro método muy similar, descrito por Phillipson (127), en el que se utilizan los estadios de vida libre de *Nippostrongylus brasiliensis*.

Ibarra y Jenkins (128) estudian la respuesta de los estadios de vida libre de *N. brasiliensis*, *H. polygyrus*, *H. contortus*, *T. colubriformis* y *O. ostertagi* ante una gran variedad de agentes antiparasitarios. Los huevos se incuban en una suspensión fecal (ajustada colorimétricamente) durante 4 días a 25 °C. Los productos que inducen efectos ovicidas o larvicidas, o bien que inhiben o retardan el desarrollo de las larvas en relación a los testigos se consideran activos; en cada caso se determina la CE₅₀, concentración aproximada requerida para afectar al 50 % de los vermes. Los cinco tricostrongílidos evidencian la actividad de los antihelmínticos de amplio espectro a concentraciones muy inferiores a 10 µg/ml. Los productos más activos son la ivermectina y algunos bencimidazoles; los menos activos fenotiacina y febantel. La especie más sensible, particularmente a los bencimidazoles, parece ser *O. ostertagi*, y

la más resistente *H. polygyrus*. De 22 antihelmínticos de espectro reducido, sólo el 10 % muestra actividad a concentraciones iguales o inferiores a 10 µg/ml. De 15 agentes antiprotozoos, tan solo uno, la pentamidina, fue activo a esa concentración frente a *N. brasiliensis* y *H. contortus*. Los estadios de vida libre de *N. brasiliensis* se eligieron para el cribado de 1.400 compuestos, obteniéndose un 10 % de productos activos a concentraciones iguales o inferiores a 10 µg/ml (según Jenkins (40) con los estadios de vida parasitaria de este mismo nematodo se obtiene un 1,5 %). Ibarra y Jenkins concluyen que estos modelos generan "falsos positivos", también es posible que produzcan "falsos negativos", pero a pesar de ello son adecuados para la selección inicial de nuevos compuestos con potencial actividad antihelmíntica (128).

Los estadios de vida libre de *H. contortus* se han utilizado para detectar y valorar actividad nematocida, en un programa de cribado farmacológico de productos de origen marino. En él se han estudiado más de 1.000 esponjas y otros organismos, y se han obtenido varios productos activos (129, 130); entre ellos, tres nuevos metabolitos, anfilactamas, que exhiben una notable actividad *in vitro* (DL₉₉ 7,5, 8,5 y 0,3 µg/ml) comparable a la de los antihelmínticos de referencia (131). No disponemos de datos sobre su actividad *in vivo*.

Finalmente, al igual que los ensayos de motilidad de L₃, las pruebas sobre el desarrollo desde huevo a L₃ de las especies de interés veterinario ("LDA, larval developmental assay") tienen una aplicación fundamental en el estudio y valoración de resistencias. Para evaluar el efecto de los distintos antihelmínticos sobre el desarrollo larvario se han propuesto cuatro procedimientos (132, 133, 134, 135), entre los que existen pequeñas diferencias (uso de medio líquido o agar, fuente de nutrientes, temperatura, adición de los fármacos antes o después de la eclosión, etc); cualquiera de ellos puede utilizarse como sistema de preselección de antihelmínticos potenciales. El método de Lacey *et al.* (134), conjuntamente con el sistema de L₃ de Gill *et al.* (89) antes mencionado, se ha empleado en la valoración de paraherquamida (93) y bafilolidas (91); estos estudios ponen de nuevo de manifiesto las diferencias de sensibilidad entre los distintos modelos. La paraherquamida no afecta al desarrollo larvario pero inhibe la motilidad; los bafilolidas, por el contrario, son efectivos en el primer sistema y tienen menor poder paralizante. La aportación más reciente en relación a este tipo de ensayos consiste en la utilización de un siste-

ma automatizado, "CPR: computerized pixel counter" (136), que permite cuantificar la motilidad de las larvas (137).

Los métodos para la evaluación de actividad nematocida que utilizan estadios de vida parasitaria se conciben *a priori* como los más satisfactorios, puesto que contra estos estadios se dirigirán los antihelmínticos potenciales que buscamos. El desarrollo de estas pruebas, sin embargo, se ha visto limitado por las dificultades inherentes al cultivo de los metazoos parásitos, dificultad y complejidad en muchos casos incompatible con las exigencias de un cribado masivo. Por otra parte, la obtención de estos estadios requiere el sacrificio de sus hospedadores y por ello, normalmente, se recurrirá al uso de especies que pueden mantenerse en animales de experimentación; *N. brasiliensis* (rata), *H. polygyrus* (ratón) y *T. colubriformis* (gerbo) son probablemente las más utilizadas.

En los sistemas que emplean estos tricostrongílidos se valora el efecto de los productos objeto de estudio sobre el desarrollo de las larvas de cuarto estadio (L_4) o sobre la viabilidad de los adultos. El periodo de desarrollo L_4 - adulto se eligió tras observar la carencia de eficacia de los bencimidazoles y probencimidazoles frente a los adultos en medios de mantenimiento (81), y a la luz del trabajo de Leland *et al.* (138), con los estadios parasitarios de *Cooperia punctata*, que puso de manifiesto que, bajo condiciones que posibilitasen el crecimiento y desarrollo de los vermes, podía evidenciarse su actividad (40).

Jenkins, Armitage y Carrington (139) y Jenkins y Carrington (140) utilizan los estados parasitarios de *N. brasiliensis*; en el primer trabajo, las L_4 , obtenidas de ratas experimentalmente infectadas, se cultivan en un medio no totalmente definido (medio NB) a 37 °C y en oscuridad, durante 7 días. La actividad de los productos se valora examinando sus efectos sobre el desarrollo y la motilidad, fundamentalmente sobre la muda de L_4 a adulto, parámetro, este último, que permite, según los autores, la interpretación objetiva de la prueba. En estas condiciones, ivermectina (< 0,01 µg/ml), morantel (0,5 µg/ml), levamisol (0,5 µg/ml), tiofanato (0,5 µg/ml) y los nueve bencimidazoles probados (entre 0,01 µg/ml y 0,1 µg/ml) muestran una gran actividad (entre paréntesis se indica la concentración mínima inhibitoria). Cuando este sistema se aplicó al cribado, se obtuvieron, como ya hemos comentado, muchos menos "falsos positivos" que con los estadios de vida libre de este mismo nematodo (40). El medio NB,

por otra parte, se puede sustituir por un medio comercial, de composición definida (CbMM, medio de mantenimiento de *Caenorhabditis briggsae*), siempre y cuando el periodo de prueba se reduzca a 5 días (140).

Bennett y Pax (92) comparan las concentraciones de albendazol, levamisol, morantel e ivermectina necesarias para inhibir la muda de las L_4 de *N. brasiliensis* (valoradas por recuento de las vainas, tras 7 días de incubación en medio RPMI con suero) con las que se requieren para inhibir la motilidad (determinada a las 48 horas de incubación, con el equipo "micromotility meter" por ellos desarrollado), y afirman que este último procedimiento es ligeramente más sensible.

Otros investigadores han utilizado las L_4 de *N. brasiliensis* en un ensayo más simple, determinando la concentración del producto necesaria para matar al 50 % de los vermes, tras un periodo de incubación de 5 días (141, 142).

Entre 1984 y 1990, dentro de un programa de colaboración entre la Universidad de California (Santa Cruz) y Syntex, se cribaron 457 extractos y 89 productos puros, procedentes de esponjas y otros invertebrados marinos, frente a los estadios parasitarios de *N. brasiliensis* con el método de Jenkins, Armitage y Carrington (139). A la concentración de 50 µg/ml, el 3,9 % de los extractos y el 22 % de los productos puros seleccionados se mostraron muy activos (eficacia superior al 95 %); el 5 % y 20 %, respectivamente, moderadamente activos (50 %-95 % de eficacia). Los resultados de los ensayos *in vivo* subsiguientes (modelo murino de coinfección con *H. polygyrus* e *Hymenolepis nana*) revelaron que uno de estos productos (no se pudieron valorar todos) - bengamida F - era activo (143), curiosamente, frente a *H. nana*.

Con los estadios parasitarios de *H. polygyrus* (144) y *T. colubriformis* - una especie "diana" - (145) se han desarrollado sistemas similares. Las L_4 de estos nematodos, aisladas de hospedadores experimentalmente infectados (ratón y gerbo, respectivamente), se incubaban en medio NB (sin lisado de eritrocitos, para *T. colubriformis*) durante 7 días para su desarrollo y muda. Las condiciones de cultivo parecen ser, sin embargo, menos satisfactorias para estas especies que para *N. brasiliensis* pues sólo se consigue un 65 % y 50 % de muda, frente al 90 % de *Nippostrongylus*. La respuesta de ambos modelos ante los antihelmínticos de amplio espectro denota una gran sensibilidad. En cada caso se estima la CE_{50} (concentra-

ción requerida para producir efectos adversos discernibles - parálisis/muerte - en el 50 % de las larvas) y la CI_{50} (concentración necesaria para inhibir la muda del 50 % de las larvas en relación a los testigos); los valores de ambos índices son similares (ligeramente inferiores las CI_{50}) aunque se observa una gran diferencia entre la CE_{50} (79,7 μ M) y la CI_{50} (0,01 μ M) de la ivermectina frente a *T. colubriformis*. Antihelmínticos de espectro reducido como nitroxinil, hexaclorofeno, rafoxamida o closantel, que sí afectaban a *N. brasiliensis*, no son efectivos en estos sistemas que podrían ser, por tanto, más específicos para la detección de antihelmínticos de amplio espectro.

La evaluación de la actividad, a través del examen de las larvas y de la muda (contando el número de vainas) requiere una observación microscópica detallada y es una tarea delicada, larga y tediosa. Este inconveniente puede subsanarse utilizando otros parámetros, de determinación más simple, que reflejen el estado de los vermes. En el modelo L_4 - adulto de *T. colubriformis* se ha comprobado que la lectura de los resultados puede agilizarse extraordinariamente (reduciéndose el tiempo necesario en más de un 95 %) si se realiza observando si se produce o no "agregación". Los adultos de *T. colubriformis* tienden a agregarse en los medios de cultivo; la ausencia de este comportamiento (probablemente como consecuencia de la inhibición del desarrollo y de la muda) denota actividad. Con este criterio, la respuesta del modelo sigue siendo igualmente satisfactoria; las concentraciones mínimas, de los antihelmínticos de amplio espectro, necesarias para inhibir completamente la agregación son iguales o inferiores a 1 μ M (146).

Otra alternativa es la utilización de un parámetro bioquímico -la secreción de acetilcolinesterasa (AChE) - (147). Rapson, Chilwan y Jenkins (148) demuestran que las L_4 y los preadultos de *N. brasiliensis*, cultivados en un medio complejo sin suero, secretan AChE a lo largo de todo el periodo de incubación (4 días); todos los antihelmínticos de amplio espectro, con independencia de su mecanismo de acción, reducen drásticamente dicha secreción ($CI_{50} < 5 \mu$ M). La determinación de actividad acetilcolinesterasa en el medio de cultivo (método de Ellman *et al.* (149) permite estimar la actividad de un modo objetivo, sencillo y rápido. A estas ventajas se suma el acortamiento del periodo de prueba (4 días versus 7 días) y la posibilidad de diferir las determinaciones (los medios pueden conservarse a -20 °C sin pérdida de actividad enzimática).

En lo que se refiere al uso de los adultos de nematodos tricostrongílidos (al que ya se ha aludido) en pruebas de cribado, su gran inconveniente fue en principio su falta de sensibilidad. Cuando se valoraba visualmente el efecto de los productos sobre la viabilidad/motilidad de los adultos de *H. polygyrus* (125) o *N. brasiliensis* (81, 150) en medios de mantenimiento, algunos antihelmínticos, notablemente bencimidazoles y probencimidazoles, no manifestaban actividad. Tampoco se registran efectos inhibitorios sobre la motilidad de adultos de *H. contortus*, con los bencimidazoles, utilizando el sistema de medida automatizado de Bennett y Pax (92) (151, 152).

La aplicación de otro criterio de valoración posibilitará la utilización de estos sistemas. Todos los antihelmínticos de amplio espectro revelan su actividad, frente a adultos de *N. brasiliensis*, cuando se determina su efecto sobre la secreción de AChE (153). El salto cualitativo que supone el uso de este parámetro bioquímico se ve claramente en los resultados obtenidos por estos autores; por ejemplo, las concentraciones de mebendazol, tiofanato e ivermectina necesarias para producir efectos adversos, visualmente perceptibles, sobre los adultos de *Nippostrongylus* (CE_{50}), tras 4 días de incubación, son superiores a 100 μ M, las que se precisan para inhibir la secreción de AChE (CI_{50}) son 0,026 μ M, 0,82 μ M y 0,00024 μ M, respectivamente. Los valores de la CI_{50} del levamisol y morantel son también bajos aunque superiores a los de la CE_{50} (4,6 μ M y 12,7 μ M frente a 2,4 μ M y 7,6 μ M). Nosotros hemos puesto a punto recientemente un sistema similar con adultos de *H. polygyrus* (154); en él, tras un periodo de incubación de 24 horas en medio RPMI, los bencimidazoles probados, así como levamisol, ivermectina y morantel inhiben la secreción de AChE a concentraciones (CI_{50}) iguales o inferiores a 3 μ M. Entre los dos modelos existen pequeñas diferencias de sensibilidad, atribuibles a diferencias metodológicas y a diferencias inherentes a los propios parásitos, pero creemos que ambos pueden ser útiles para la selección primaria de antihelmínticos potenciales. Disponemos de poca información sobre su capacidad selectiva en el cribado, pero, en nuestro caso, los primeros datos (142 y observaciones no publicadas) sugieren que este método proporciona, como cabía esperar, menos "falsos positivos" que *Caenorhabditis elegans*.

En 1985, tras estudiar el efecto de varios antihelmínticos sobre la ingestión (medida a través de la captación de un fluorocromo) y oviposición de *T. colubriformis*, Bottjer y Bone (155) proponen el uso de estos parámetros como indicado-

res de actividad antihelmíntica (ambos involucran motilidad pero permiten una cuantificación más objetiva, sin equipos especiales, que la motilidad corporal). Desconocemos si este sistema, aparentemente poco sensible a los derivados bencimidazólicos, se ha utilizado en pruebas de cribado pero, ciertamente el bombeamiento faríngeo como diapausa farmacológica de la ivermectina ha despertado un gran interés.

Dejando ya a un lado los modelos desarrollados con estadios parasitarios de tricostrongílidos, y obviando la mención de procedimientos puntuales con estos u otros nematodos, vamos ahora a examinar otros sistemas de cribado, que optan por la utilización de *Trichinella* spp. o *Ascaris suum*.

La primera propuesta se orienta hacia la búsqueda de compuestos eficaces frente a los estadios tisulares de *Trichinella spiralis* (156). Las L₁ de este nematodo, obtenidas de ratones experimentalmente infectados, se incuban en medio NB (139) a 37 °C, en presencia de distintos antihelmínticos, durante 4 días (en este medio se afirma que permanecen móviles y aparentemente en buen estado durante 7 días). La actividad se evalúa visualmente, comparando el estado de las larvas testigo (que al cuarto día muestran un movimiento sinusoidal típico, "estado serpentina") y tratadas (motilidad y estado). Las concentraciones mínimas necesarias para modificar significativamente el estado de las larvas (CMI) son muy bajas para los bencimidazoles (entre 0,001 y 0,05 µg/ml) y organofosforados (1 µg/ml) ensayados. Levamisol (CMI 10 µg/ml), metiridina (CMI 20 µg/ml) y pirantel (CMI 50 µg/ml) son menos eficaces. Según sus autores, si el cribado se realiza exigiendo actividad a concentraciones iguales o inferiores a 10 µg/ml, el sistema no detecta compuestos que actúan sólo sobre la fase intestinal de la infección, pero han comprobado que sí es muy selectivo (no produce "falsos positivos").

Gómez Barrio, Bolás Fernández y Martínez Fernández (157) se plantean el desarrollo de un sistema similar con *Trichinella pseudospiralis* pero, cuando incuban las larvas en medio NB, observan una elevada mortalidad (62 % a los 4 días) y pérdida de su capacidad infectante (a las 48 horas). Ello les lleva a buscar otro medio y condiciones que posibiliten el contacto *in vitro* con larvas en "buen estado" y aseguren la objetividad de las determinaciones. Las larvas se mantendrán finalmente en medio HBSS-199, en presencia o ausencia de los fármacos durante 48 horas (en contenedores gaseados con CO₂), y su viabilidad se

determinará por inoculación a ratón, estimando la reducción en el número de adultos intestinales que induce el tratamiento *in vitro*. Siguiendo estas pautas, valoran el efecto de cinco bencimidazoles, un probencimidazol, levamisol e ivermectina sobre L₁ de *T. pseudospiralis* y *T. spiralis*. En términos generales, ambas triquinas responden de un modo similar, mostrándose particularmente sensibles a los carbamatos de bencimidazol y a la ivermectina; levamisol, tiabendazol y especialmente el probencimidazol febantel son menos eficaces (158). Herrero *et al.* (159) utilizan este sistema para valorar nuevos productos de síntesis. Otros autores cultivan las larvas de *T. spiralis* en medio RPMI (37 °C, 5 % CO₂) durante 3 días, en presencia y ausencia de los productos objeto de estudio (cambiando diariamente el medio) y, finalmente, determinan la viabilidad larvaria mediante un método colorimétrico basado en la reducción de MTT (160).

Las L₃ de *A. suum* (obtenidas de conejos experimentalmente infectados) han sido sujeto de otros ensayos. Rew, Urban y Douvres (126) las exponen a distintos antihelmínticos, bajo condiciones de cultivo que permiten su desarrollo y muda (en presencia y ausencia de suero). La actividad, tras 7 días de incubación, se determina examinando la supervivencia, motilidad y muda a L₄. Albendazol (0,01 µg/ml), mebendazol (0,01 µg/ml), tiabendazol (0,1 µg/ml), albendazol sulfóxido (0,1 µg/ml) y albendazol sulfona (1 µg/ml) inhiben el desarrollo de L₃ a L₄ aunque, a estas concentraciones las larvas permanecen vivas. L-te-tramisol y morantel inhiben la muda y reducen la supervivencia a concentraciones superiores o iguales a 1 µg/ml. La ivermectina bloquea el desarrollo a 1 µg/ml; se observa además que su actividad se reduce en presencia de suero. Los autores proponen el uso de este sistema para el cribado y para la detección de antihelmínticos residuales en los tejidos animales destinados al consumo. Según Bennett y Pax (97), las concentraciones de albendazol (0,01 µg/ml), levamisol (1 µg/ml) e ivermectina (1 µg/ml) necesarias para inhibir la muda de las L₃ de *A. suum* (medio RPMI con un 10% de suero, 7 días de incubación) son iguales a las necesarias para inhibir la motilidad (valorada al segundo día de incubación), cuando ésta se evalúa a través del "micromotility meter" que han desarrollado. De morantel se requiere una concentración mayor para inhibir la motilidad (1 µg/ml frente a 0,1 µg/ml).

Como conclusión, queremos resaltar que todos los sistemas que hemos ido examinando a lo largo de esta revisión configuran un amplio abanico de posibilidades para la evaluación inicial *in*

vitro de productos de síntesis o de origen natural, y la preselección, previa al cribado primario *in vivo*, de antihelmínticos potenciales. Todos ellos tienen ventajas e inconvenientes, y cada investigador debe elegir el modelo (o modelos) que estime más adecuado; los factores a considerar, como hemos visto, son múltiples:

- elección de la especie (determinada fundamentalmente por su disponibilidad, que va ligada a su facilidad de mantenimiento en el laboratorio, exigencia o no de hospedadores experimentales y tipo de hospedador preciso).

- elección del estadio o fase de desarrollo (su obtención puede requerir o no el sacrificio de animales de experimentación, y su manipulación y condiciones de cultivo, tiempo y medios, ser más o menos complejas).

- criterio de actividad (considerando sobre todo la sencillez y objetividad de su evaluación).

Todos estos factores condicionan la sensibilidad y la capacidad selectiva del modelo (además de sus costes) y todos buscamos el mejor equilibrio posible entre ellos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Thompson DP, Klein RD, Geary TG. Prospects for rational approaches to anthelmintic discovery. *Parasitology* 1997; 113: S217-S238
2. Gutteridge WE. Designer drugs: pipe-dreams or realities?. *Parasitology* 1997; 114: S145-S151
3. Geary TG, Thompson DP, Klein RD. Mechanism-based screening: discovery of the next generation of anthelmintics depends upon more basic research. *Int J Parasitol* 1999; 29: 105-112
4. Tiner JD. Effects of phenothiazine on nematodes *in vitro*: criteria for selection of organisms in preliminary anthelmintic screen tests. *Am J Vet Res* 1965; 26: 1204-1211
5. Cavier R. Chemotherapy of intestinal nematodes. En: "Chemotherapy of Helminthiasis", vol. 1. Editado por R. Cavier y F. Hawking. Pergamon Press, 1973; p. 217-403
6. Deschiens R. Etude d'un test de détermination des propriétés anthelminthiques des dérivés triphénylméthaniques. *Compt Rend Soc Biol* 1944; 138: 201-202
7. Deschiens R. L'action anthelminthique des médicaments. *Bull Soc Pathol Exo* 1944; 37: 111-125
8. Gaulin J. Etude critiques des méthodes biologiques d'essai des anthelminthiques. Thèse Doct. Pharmacie (Paris) 1954, No. 220
9. Cavier R, Gaulin J. Un nouvel anthelminthique: le dilaurate de diethylene-diamine. *Bull Soc Pathol Exot*

1955; 48: 393-396

10. Brienne MJ, Jacques J, Gayral P, Dusset F. "Modèles ouverts" du tétramisole et de l'iso-tétramisole. Préparation et activité sur les nématodes. *Eur J Med Chem* 1981; 16: 363-366
11. Amarouch H, Loiseau PR, Bacha C, Caujolle R, Payard M, Loiseau PM, Bories C, Gayral P. Imidazo(2,1-b)thiazoles: analogues of levamisole. *Eur J Med Chem - Chim Thérap* 1987; 22: 463-466
12. Loiseau PR, Bonnafous M, Caujolle R, Payard M, Loiseau PM, Bories C, Gayral P. Synthesis and anthelmintic evaluation of 2-amidino-1,3,4-oxa and 1,3,4-thiadiazoles, structurally related to tetramisole. *Il Farmaco* 1990; 45: 953-963
13. Danan A, Charon D, Kirkiacharian S, Bories C, Loiseau PM. Synthesis and antiparasitic activities of amidinic azolated derivatives. *Il Farmaco* 1997; 52: 227-229
14. Loiseau PM, Lubert P, Wolf JG. Synthesis and *in vitro* anthelmintic properties of some new dithiaarsanes. *Arzneim Forsch* 1999; 49: 944-950
15. Kadlubowski R, Rebizak L. Investigations of compounds with potential antiparasitic action. V. Antihistaminics. *Wiad Parazytol* 1980; 1: 59-64
16. Moral Rama A. Técnicas para el control sistemático de antihelmínticos. Nematodos gastrointestinales. Prueba de una serie de indol-hidracinas. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria. Madrid. 1967
17. Krizkova L, Balanova J, Balan J. Incidence of antiprotozoal and antivermal activities in imperfect fungi collected in the People's Republic of Mongolia. *Biol Brat C Vseob Biol* 1979; 34: 241-245
18. Krizkova L, Dobias J, Podova M, Nemec P. Nematocidal effects of entomophilic and entomophagous fungi. *Folia Microbiol* 1979; 24: 171-175
19. Nair MG, Putnam AR, Mishra SK, Mulks MH, Taft WH, Keller JE, Miller JR, Zhu PP, Meinhart JD, Lynn DG. Faeriefungin: a new broad spectrum antibiotic from *Streptomyces griseus* var. *autotrophicus*. *J Nat Prod* 1989; 52: 797-809
20. Peters BG. Toxicity tests with the vinegar eelworm. I. Counting and culturing. *J Helminthol* 1952; 26: 97-110
21. Mackie A, Parnell IW. A comparison of the results of four *in vitro* anthelmintics testing techniques. *J Pharm Pharmacol* 1955; 7: 416-420
22. Bacikova D, Betina V, Nemec P. Anthelmintic activity of antibiotics. *Nature*, 1965; 4991: 1371-1372
23. Vanfleteren JR, Roets DE. The influence of some anthelmintic drugs on the population growth of the free-living nematodes *Caenorhabditis briggsae* and *Turbatrix acetii* (Nematoda: Rhabditida). *Nematologica* 1972; 18: 325-328
24. Tiner JB, Rangaswami G. Effect of mycothricin complex on the nematode *Rhabditis briggsae*. *Proc*

Helminthol Soc Wash 1957; 24: 70-71

25. Fiakpui EZ. Some effects of piperazine and methyridine on the free living nematode *Caenorhabditis briggsae* (Rhabditidae). *Nematologica* 1967; 13: 241-255

26. Platzer EG, Eby JE, Friedman PA. Growth inhibition of *Caenorhabditis elegans* with benzimidazoles. *J Nematol* 1977; 9: 280

27. Simpkin KG, Coles GC. The use of *Caenorhabditis elegans* for anthelmintic screening. *J Chem Techn Biotech* 1981; 31: 66-69

28. Haber C L, Heckaman C L, Li G P, Thompson DP, Whaley HA, Wiley VH. Development of a mechanism of action-based screen for anthelmintic microbial metabolites with avermectinlike activity and isolation of milbemycin-producing *Streptomyces* strains. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; 35: 1811-1817

29. Conder GA, Johnson SS, Guimond PM, Geary TG, Lee BL, Winterrowd CA, Lee BH, Dirom PJ. Utility of a *Haemonchus contortus*/jird (*Meriones unguiculatus*) model for studying resistance to levamisole. *J Parasitol* 1991; 77: 83-86

30. Dutton CJ, Gibson SP, Goudie AC, Holdom KS, Pacey MS, Ruddock JC, Bu'lock JD, Richards MK. Novel avermectins produced by mutational biosynthesis. *J Antibiot* 1991; 44: 357-365

31. Brenner S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 1974; 77: 71-94

32. Martínez -Grueiro MM. *Caenorhabditis elegans*: un nuevo modelo para el cribado farmacológico antihelmíntico. Tesina de Licenciatura 1984. Universidad Complutense. Madrid.

33. Hirsh D, Oppenheim D, Klass M. Development of the reproductive system of *Caenorhabditis elegans*. *Develop Biol* 1976; 49: 200-219

34. Coles GC. Anthelmintic activity of triclabendazole. *J Helminthol* 1986; 60: 210-212

35. Coles GC. Models of infection for intestinal worms. En: "Experimental Models in Antimicrobial Chemotherapy", Vol. 3 Academic Press, Londres, 1986; p. 333-351

36. Fasiuddin A, Campbell WC. *Haemonchus contortus* (Nematoda: Trichostrongylidae) is much more sensitive than *Caenorhabditis elegans* (Nematoda: Rhabditidae) to the ovicidal action of thiabendazole. *J Parasitol* 2000; 86: 628-630

37. Martínez-Grueiro MM, Martínez-Fernández AR. Actividad de algunos antihelmínticos convencionales sobre *Caenorhabditis elegans*. *Rev Ibér Parasitol* 1988; 48: 221-226

38. Spence AM, Malone KMB, Novak MMA, Woods RA. The effects of mebendazole on the growth and development of *Caenorhabditis elegans*. *Can J Zool* 1982; 60: 2616-2623

39. Patel MT, Campbell WC. Inhibitory effect of chlor-

promazine on nematode eggs and larvae. *J Parasitol* 1998; 84: 191-192

40. Jenkins DC. *In vitro* screening test for anthelmintics. En: "Animals Models in Parasitology", ed. Owen DG, McMillan Press Ltd., Londres, 1982; p. 173-186

41. Düwel D. Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene Series A 1987; 267: 291

42. Coles GC. Recent advances in laboratory models for evaluation of helminth chemotherapy. *Br Vet J* 1990; 146: 113-119

43. Martínez-Grueiro MM, Cremades-Redondo M, Torres- Guijarro A, Álvarez-Builla Gómez J, Novella-Robisco JL. Estudio de la actividad antihelmíntica de sales de 1-(1-arilvinil)piridinio. *Rev Ibér Parasitol* 1987; Vol. Ext.: 239-244

44. Ondeyka JG, Goegelman RT, Schaeffer JM, Kelemen L, Zitano L. Novel antinematodal and antiparasitic agents from *Penicillium charlesii*. I. Fermentation, isolation and biological activity. *J Antibiot* 1990; 43: 1375-1379

45. Singh SB, Smith JL, Sabnis GS, Dombrowski AW, Schaeffer JM, Goetz MA, Bills GF. Structure and conformation of ophiobolin K y 6-epiophiobolin K from *Aspergillus ustus* as a nematocidal agent. *Tetrahedron* 1991; 47: 6931-6938

46. Rasoanaivo P, Ratsimamanga-Urveg S. Biological evaluation of plants with reference to the Malagasy flora. *Napreca. Madagascar* 1993; 72-83: 9-43

47. Stadler M, Anke H, Sterner O. New nematocidal and antimicrobial compounds from the basidiomycete *Cheimonophyllum candidissimum* (Bert & Curt.) Sing. I. Producing organism, fermentation, isolation, and biological activities. *J Antibiot* 1994; 47: 1284-1289

48. Stadler M, Mayer A, Anke H, Sterner O. Fatty acids and other compounds with nematocidal activity from cultures of Basidiomycetes. *Planta Med* 1994; 60: 128-132

49. Schaeffer JM, Blizzard TA, Ondeyka J, Goegelman R, Sinclair PJ, Mrozik H. [3H]Paraherquamide binding to *Caenorhabditis elegans*. *Biochem Pharmacol* 1992; 43: 679-684

50. Schaeffer JM, Bergstrom AR, Frazier EG, Underwood D. Nematocidal activity of MK-801 analogs and related drugs. Structure-activity relationships. *Biochem Pharmacol* 1994; 48: 411-418

51. Arena JP, Liu KK, Paress PS, Frazier EG, Cully DF, Mrozik H, Schaeffer JM. The mechanism of action of avermectins in *Caenorhabditis elegans*: correlation between activation of glutamate-sensitive chloride current, membrane binding, and biological activity. *J Parasitol* 1995; 81: 286-294

52. Hu K, Li J, Webster JM. Nematocidal metabolites produced by *Photobacterium luminescens* (Enterobacteriaceae), bacterial symbiont of entomopathogenic nematodes. *Nematology* 1999; 1: 457-469

53. McGaw LJ, Jäger AK, Van Staden J. Antibacterial,

- anthelmintic and anti-amoebic activity in South African medicinal plants. *J Ethnopharmacol* 2000; 72: 247-263
54. Williams PL, Dusenbery DB. Using *Caenorhabditis elegans* to predict mammalian acute lethality to metallic salts. *Toxicol Ind Health* 1988; 4: 469-478
55. Middenford PL, Dusenbery DB. Fluoroacetic acid is a potent and specific inhibitor of reproduction in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J Nematol* 1993; 25: 573-577
56. Dhawan R, Dusenbery DB, Williams PL. Comparison of lethality, reproduction, and behavior as toxicological endpoints in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J Toxicol Environ Health* 1999; 58: 451-462
57. Dhawan R, Dusenbery DB, Williams PL. A comparison of metal-induced lethality and behavioral responses in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Environ Toxicol Chem* 2000; 19: 3061-3067
58. Mayer A, Anke H, Sterner O. Screening of higher fungi for the production of nematocidal compounds using *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood as test organism. *Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent* 1996; 61/3a: 839-847
59. Yanagida J, Matsushashi R, Watanabe I, Satou T, Koike K, Nikaido T, Akao S. A new subculture and nematocidal assay using a species of Diplogastridae. *Chem Pharm Bull* 1998; 46: 1261-1264
60. Watanabe I, Koike K, Satou T, Nikaido T. Nematocidal activity of picrodendrins against a species of Diplogastridae. *Biol Pharm Bull* 1999; 22: 1310-1313
61. Watanabe I, Koike K, Satou T, Nikaido T. Nematocidal activity of quassinoids against a species of Diplogastridae. *Biol Pharm Bull* 2000; 23: 723-726
62. Kimura Y, Mori M, Hyeon S, Suzuki A, Mitsui Y. A rapid and simple method for assay of nematocidal activity and its application to measuring the activities of dicarboxylic esters. *Agric Biol Chem* 1981; 45: 249-251
63. Otoguro K, Liu Z-X, Fukuda K, Li Y, Iwai Y, Tanaka H, Omura S. Screening for new nematocidal substances of microbial origin by a new method using the pine wood nematode. *J Antibiot* 1988; XLI: 573-575
64. Alen Y, Nakajima S, Nitoda T, Baba N, Kanzaki H, Kawazu K. Antinematodal activity of some rainforest plants against the pinewood nematode *Bursaphelenchus xylophilus*. *Z Naturforschung* 2000; 55c: 295-299
65. Alen Y, Nakajima S, Nitoda T, Baba N, Kanzaki H, Kawazu K. Two antinematodal phenolics from *Knema hookeriana*, a sumatran rainforest plant. *Z Naturforschung* 2000; 55c: 300-303
66. Kawazu K, Nishii Y, Ishii K, Tada M. Convenient screening method for nematocidal activity. *Agric Biol Chem* 1980; 44: 631-635
67. Shorb DA, Haberman RT. Effect of phenotiazine on the development of roundworm larvae in the feces. *Vet Med* 1940; 35: 454-457
68. Levine ND. The use of horse strongyle larvae in screening compounds for anthelmintic activity. *Trans Illinois St Acad Sci* 1950; 43: 233-236
69. Deschiens R. Sur un test d'activité anthelminthique des médicaments. *Bull Acad Nat Med* 1954; 138: 184-185
70. Tiner JD. A preliminary *in vitro* test for anthelmintic activity. *Exp Parasitol* 1958; 7: 232-235
71. Leland SE, Bogue JH. Laboratory tests on the anthelmintic activity of thiabendazole against the free-living stages of *Strongyloides ransomi*. *J Parasitol* 1964; 50: 61
72. Parnell IW. A modified technique for preliminary screening of compounds for anthelmintic activity against eggs and larvae of bursate nematodes of sheep. *J Helminthol* 1964; 38: 47-56
73. Egerton JR. The ovicidal and larvicidal effect of thiabendazole on various helminth species. *Texas Rep Biol. Med* 1969; 27: 561-580
74. Hoff DR, Fisher MH, Bochis RJ, Lusi A, Waksmunski F, Egerton JR, Yakstis JJ, Cuckler AC, Campbell WC. A new broad-spectrum anthelmintic: 2-(4-thiazolyl)-5-isopropoxycarbonylamino-benzimidazole. *Experientia* 1970; 26: 550-551
75. Lacey E, Brady RL, Prichard RK, Watson TR. Comparison of inhibition of polymerisation of mammalian tubulin and helminth ovicidal activity by benzimidazole carbamates. *Vet Parasitol* 1987; 23: 105-119
76. Le Jambre LF. Egg hatch as an *in vitro* assay of thiabendazole resistance in nematodes. *Vet Parasitol* 1976; 2: 385-391
77. Coles GC, Simpkin KG. Resistance of nematode eggs to the ovicidal activity of benzimidazoles. *Res Vet Sci* 1977; 22: 386-387
78. Hall CA, Campbell NJ, Richardson NJ. Levels of benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* recorded from an egg hatch test procedure. *Res Vet Sci* 1978; 25: 360-363
79. Whitlock HV, Kelly JD, Porter CJ, Griffin DL, Martin ICA. *In vitro* field screening for anthelmintic resistance in strongyles of sheep and horses. *Vet Parasitol* 1980; 7: 215-232
80. Dobson RJ, Donald AD, Waller PJ, Sonowdn KL. An egg-hatch assay for resistance to levamisole in trichostrongyloid nematode parasites. *Vet Parasitol* 1986; 19: 77-84
81. Coles GC, McNeillie RM. The response of nematodes *in vivo* and *in vitro* to some anthelmintics. *J Helminthol* 1977; 51: 323-326
82. Martínez-Grueiro MM, Martínez-Fernández AR, Cremades-Redondo M. Efecto *in vitro* de algunos antielmínticos sobre el desarrollo de los huevos de *Heligmosomoides polygyrus*. *Rev Ibér Parasitol* 1988; 48: 335-341
83. Cuadro A, Pérez-Butragueño J, Pastor Maeso M,

- Álvarez-Builla J, Martínez- Grueiro MM, Martínez - Fernández AR. Styryl and azastyryl 1,3-benzazoles with anthelmintic activity. *Il Farmaco* 1992; 47: 477-488
84. Ochoa C, Rodríguez J, López -García ML, Martínez AR, Martínez MM. Anthelmintic activity of 6,7-diarylpteridines. *Arzneim Forsch* 1996; 46: 643-648
85. Schulz HP. An *in vitro* model for studying anthelmintic compounds (Abstract). Third International Congress of Parasitology, Munich. Proceedings 1974; vol 1, p. 469
86. Boisvenue RJ, Brandt MC, Galloway RB, Hendrix JC. *In vitro* activity of various anthelmintic compounds against *Haemonchus contortus* larvae. *Vet Parasitol* 1983; 13: 341-347
87. Hood JD, Banks RM, Brewer MD, Fish JP, Manger BR, Poulton ME. A novel series of milbemycin antibiotics from *Streptomyces* strain E225. I. Discovery, fermentation and anthelmintic activity. *J Antibiot* 1989; 42: 1593-1598
88. Blanchflower SE, Banks RM, Everett JR, Manger BR, Reading C. New paraherquamide antibiotics with anthelmintic activity. *J Antibiot* 1991; 44: 492-497
89. Gill JH, Redwin JM, Wyk JAVan, Lacey E. Detection of resistance to ivermectin in *Haemonchus contortus*. *Int J Parasitol* 1991; 21: 771-776
90. Gill JH, Lacey E. *In vitro* activity of paraherquamide against the free-living stages of *Haemonchus contortus*, *Trichostrongylus colubriformis* and *Ostertagia circumcincta*. *Int J Parasitol* 1993; 23: 375-381
91. Lacey E, Gill JH, Power ML, Richards RW, O'Shea MG, Rothschild JM. Bafilolides, potent inhibitors of the motility and development of the free-living stages of parasitic nematodes. *Int J Parasitol* 1995; 25: 349-357
92. Bennett JL, Pax RA. Micromotility meter: an instrument to evaluate the action of drugs on motility of larval and adult nematodes. *Parasitology* 1986; 93: 341-346
93. Folz SD, Pax R.A, Thomas EM, Bennett JL, Lee BL, Conder GA. Detecting *in vitro* anthelmintic effects with a micromotility meter. *Vet Parasitol* 1987; 24: 241-250
94. Folz SD, Pax RA, Thomas EM, Bennett JL, Lee BL, Conder GA. Motility response of benzimidazole-resistant *Haemonchus contortus* larvae to several anthelmintics. *Proc Helminthol Soc Washington* 1987; 54: 249-253
95. Folz SD, Pax RA, Thomas EM, Bennett JL, Lee BL, Conder GA. Development and validation of an *in vitro* *Trichostrongylus colubriformis* motility assay. *Int J Parasitol* 1987; 17: 1441-1444
96. Folz SD, Pax RA, Thomas EM, Bennett JL, Lee BL, Conder GA. Development of a novel *in vitro* equine anthelmintic assay. *J Vet Pharmacol Therap* 1988; 11: 177-182
97. Geary TG, Sims SM, Thomas EM, Vanover L, Davis JP, Winterrowd CA, Klein RD, Ho NFH, Thompson DP. *Haemonchus contortus*: ivermectine induced paralysis of the pharynx. *Exp Parasitol* 1993; 77: 88-96
98. Douch PGC, Harrison GBL, Buchanan LL, Greer KS. *In vitro* bioassay of sheep gastrointestinal mucus for nematode paralysing activity mediated by substances with some properties characteristic of SRS-A. *Int J Parasitol* 1983; 13: 207-212
99. Douch PGC, Morum PE. The effects of anthelmintics on ovine larval nematode parasite migration. *Int J Parasitol* 1994; 24: 321-326
100. Wagland BM, Jones WO, Hribar L, Bendixsen T, Emery DL. A new simplified assay for larval migration inhibition. *Int J Parasitol* 1992; 22: 1183-1185
101. Rabel B, McGregor R, Douch PGC. Improved bioassay for estimation of inhibitory effects of ovine gastrointestinal mucus and anthelmintics on nematode larval migration. *Int J Parasitol* 1994; 24: 671-676
102. Patel MT, Campbell WC. Enhanced ability of third-stage larvae of *Haemonchus contortus* to withstand drug exposure following chemically induced exsheathment. *J Parasitol* 1997; 83: 971-973
103. Conder GA, Johnson SS. Viability of infective larvae of *Haemonchus contortus*, *Ostertagia ostertagi*, and *Trichostrongylus colubriformis* following exsheathment by various techniques. *J Parasitol* 1996; 82: 100-102
104. Molan AL, Duncan A, Barry TN, McNabb WC. Effects of condensed tannins and sesquiterpene lactones extracted from chicory on the viability of deer lungworm larvae. *Proc New Zealand Soc Anim Prod* 2000; 60: 26-29
105. Molan AL, Hoskin SO, Barry TN, McNabb WC. Effects of condensed tannins extracted from four forages on the viability of the larvae of deer lungworms and gastrointestinal nematodes. *Vet Rec* 2000; 147: 44-48
106. Molan AL, Waghorn GC, Min BR, McNabb WC. Effects of condensed tannins extracted from seven herbages on *Trichostrongylus colubriformis* larval migration *in vitro*. *Folia Parasitol* 2000; 47: 39-44
107. Leland SE. Methods of testing protozoacides and anthelmintics. En: "Disinfection, sterilization and preservation", ed. S.S. Block, Philadelphia, USA, 1983; p.1009-1011
108. Bhopale GM, Bhatnagar BS. Evaluation of the efficacy of various anthelmintics against *Ancylostoma caninum* larvae *in vitro*. *Indian Vet J* 1984; 61: 103-106
109. Martínez-Grueiro MM, Martínez- Fernández A R, Cremades-Redondo M. Viabilidad de L3 de *Heligmosomoides polygyrus* postratamiento *in vitro* con diferentes antihelmínticos. *Rev Ibér Parasitol* 1988; 48: 411-415
110. Bories C, Loiseau P, Legrand T, Gayral P. Utilisation de larves infectantes de *Nippostrongylus brasiliensis* en milieu axénique pour l'étude de substances nematocides. *Bull Soc Franç Parasitol* 1987; 5: 75-80
111. Gbadamassi M, Barascut JL, Imbach JL, Gayral P. Nouveaux anti-parasitaires dans la série du

benzimidazole: synthèse d'hétéroarylamino-2 benzimidazoles et évaluation de leur activité biologique. Eur J Med Chem 1988; 23: 225-232

112. Besanty P, Mayrargue J, Moussa GE, Shaaban ME, Gayral P, Miocque M. Synthèse de benzo et dibenzothiazépines nitrées à visée anti-parasitaire. Eur J Med Chem 1988; 23: 403-405

113. Loiseau PM, Rekik L, Madaule Y, Gayral P, Wolf JG. Design, synthesis and biological study of new anti-parasitic spiroarsoranes. Arzneim Forsch 1993; 43: 1004-1009

114. Kiuchi F, Miyashita N, Tsuda Y, Kondo K, Yoshimura H. Studies on crude drugs effective on visceral larva migrans. I. Identification of larvicidal principles in Betel Nuts. Chem Pharm Bull 1987; 35: 2880-2886

115. Kiuchi F, Nakamura N, Tsuda Y, Kondo K, Yoshimura H. Studies on crude drugs effective on visceral larva migrans. II. Larvicidal principles in Kaempferia rhizoma. Chem Pharm Bull 1988; 36: 412-415

116. Kiuchi F, Nishizawa S, Kawanishi H, Kinoshita S, Ohsima H, Uchitani A, Sekino N, Ishida M, Kondo K, Tsuda Y. Nematocidal activity of long alkyl chain amides, amines, and their derivatives on dog round-worm larvae. Chem Pharm Bull 1992; 40: 3234-3244

117. Akao N, Fukunaga M, Kondo K, Tsuda Y. *In vitro* assessment of morbidity of *Toxocara canis* larvae using a dye exclusion assay. Jpn J Parasitol 1992; 41: 519-526

118. Sugimoto N, Goto Y, Akao N, Kiuchi F, Kondo K, Tsuda Y. Mobility inhibition and nematocidal activity of asarone and related phenylpropanoids on second-stage larvae of *Toxocara canis*. Biol Pharm Bull 1995; 18: 605-609

119. Akao N, Sugimoto N, Thu AM, Kondo K, Tsuda Y, Fujita K. A tetrazolium dye (MTT) assay for testing larval viability using second-stage larvae of *Toxocara canis*. Jpn J Parasitol 1995; 44: 1-5

120. Comley JC, Rees MJ, O'Dowd AB. The application of biochemical criteria to the assessment of macrofilarial viability. Trop Med Parasitol 1988; 39: 456-459

121. Comley JC, Rees MJ, Turner CH, Jenkins DC. Colorimetric quantitation of filarial viability. Int J Parasitol 1989; 19: 77-83

122. Towson S, Shay KE, Dobinson AR, Connelly C, Comley JC, Zea FG. *Onchocerca gutturosa* and *O. volvulus*: studies on the viability and drugs responses of cryopreserved adult worms *in vitro*. Trans Royal Soc Trop Med Hyg 1989; 83: 664-669

123. Towson S, Dobinson AR, Townsend J, Siemienska J, Zea FG. The effects of ivermectin used in combination with other known antiparasitic drugs on adult *Onchocerca gutturosa* and *O. volvulus* *in vitro*. Trans Royal Soc Trop Med Hyg 1990; 84: 411-416

124. Towson S, Tagboto SK. The effects of ivermectin on the viability of *Onchocerca linealis* microfilariae *in vitro* and on their subsequent development in the black-fly vector, *Simulium ornatum*. Trop Med Parasitol 1991; 42: 31-37

125. Grunberg E, Cleeland R. Anthelmintic activity of 1,4 bis(2-diethylaminoethoxy)anthraquinone dihydrochloride in experimentally infected animals and *in vitro*. J Parasitol 1967; 53: 786-792

126. Rew RS, Urban JF, Douvres FW. Screen for anthelmintics, using larvae of *Ascaris suum*. Am J Vet Res 1986; 47: 869-873

127. Phillipson RF. Life cycle and chemotherapeutic studies on *Nippostrongylus brasiliensis*. PhD Thesis 1966. University of London.

128. Ibarra OF, Jenkins DC. The relevance of *in vitro* anthelmintic screening tests employing the free-living stages of trichostrongylid nematodes. J Helminthol 1984; 58: 107-112

129. Capon RJ, Barrow RA, Rochfort S, Jobling M, Skene C, Lacey E, Gill J, Friedel T, Wadsworth D. Marine nematocides: tetrahydrofurans from a southern Australian brown alga, *Notheia anomala*. Tetrahedron 1998; 54: 2227-2242

130. Capon RJ, Skene C, Lacey E, Gill JH, Wadsworth D, Friedel T. Geodin A magnesium salt: a novel nematocide from a southern Australian marine sponge. J Nat Prod 1999; 62: 1256-1259

131. Ovenden SPB, Capon RJ, Lacey E, Gill JH, Friedel T, Wadsworth D. Amphilactams A-D: novel nematocides from southern Australian marine sponges of the genus *Amphimedon*. J Org Chem 1999; 64: 1140-1144

132. Coles GC, Tritschler JP, Giordano DJ, Laste NJ, Schmidt AL. Larval development test for detection of resistant nematodes. Res Vet Sci 1988; 45: 50-53

133. Taylor MA. A larval development test for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of sheep. Res Vet Sci 1990; 49: 198-202

134. Lacey E, Redwin JM, Gill J, Demargheriti VM, Waller PJ. A larval development assay for the simultaneous detection of broad spectrum anthelmintic resistance. En: "Resistance of parasites to antiparasitic drugs", Boray, J.C.; Martin, P.J.; Roush, T.H., Rahway NJ, USA: MSD AGVET, 1990; p. 177-184

135. Hubert J, Kerboeuf DA. A microlarval development assay for the detection of anthelmintic resistance in sheep nematodes. Vet Rec 1992; 130: 442-446

136. Solomon F, Michael B, Hamelin M, Smith M. The wiggleometer. Measuring larval movement in 96-well format. J Assoc Lab Automat 2000; 5: 79-84

137. Michael B, Meinke PT, Shoop W. Comparison of ivermectin, doramectin, selamectin, and eleven intermediates in a nematode larval development assay. J Parasitol 2001; 87: 692-696

138. Leland SE, Ridley RK, Slonka GF, Zimmerman GL. Detection of activity for various anthelmintics

- against *in vitro* produced *Cooperia punctata*. Am J Vet Res 1975; 36: 449-456
139. Jenkins DC, Armitage R, Carrington TS. A new primary screening test for anthelmintics utilizing the parasitic stages of *Nippostrongylus brasiliensis*, *in vitro*. Z Parasitenk 1980; 63: 261-269
 140. Jenkins DC, Carrington TS. An *in vitro* screen for anthelmintics employing *Nippostrongylus brasiliensis* in a defined medium. Vet Parasitol 1982; 11: 223-230
 141. Gordon S, Costa L, Incerti M, Manta E, Saldaña J, Domínguez L, Mariezcurrena R, Suescun L. Synthesis and *in vitro* anthelmintic activity against *Nippostrongylus brasiliensis* of new 2-amino-4-hydroxy-*valerolactam* derivatives. Il Farmaco 1998; 52: 603-608
 142. Ochoa C, Rodríguez M, Domínguez L, Saldaña J, Di Maio R, Alonso-Villalobos P, Martínez-Grueiro MM. Nematocide activity of 6,7-diarylpteridines. J Helminthol 1999; 73: 333-336
 143. Crews P, Hunter LM. The search for antiparasitic agents from marine animals. En: "Marine Biotechnology", vol. 1: "Pharmaceutical and Bioactive Natural Products", editado por D.H. Attaway y O.R. Zaborsky. Plenum Press, New York, 1993; p. 343-389
 144. Jenkins DC, Ibarra DF. *Nematospiroides dubius*: response of the late four-stage larvae to anthelmintics *in vitro*. Z Parasitenk 1984; 70: 395-402
 145. Rapson EB, Jenkins DC, Topley P. *Trichostrongylus colubriformis*: *in vitro* culture of parasitic stages and their use for the evaluation of anthelmintics. Res Vet Sci 1985; 39:90-94
 146. Jenkins DC, Rapson EB, Topley P. The aggregation response of *Trichostrongylus colubriformis*: a basis for the rapid interpretation of *in vitro* anthelmintic screens. Parasitology 1986; 93: 531-537
 147. Rapson EB, Jenkins DC. Acetylcholinesterase: a biochemical parameter for the interpretation of *in vitro* anthelmintic screens. Parasitology 1984; 89:1xxi
 148. Rapson EB, Chilwan AS, Jenkins DC. Acetylcholinesterase secretion -a parameter for the interpretation of *in vitro* anthelmintic screens. Parasitology 1986; 92: 425-430
 149. Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Featherstone RM. A new y rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochem Pharmacol 1961; 7: 88-95
 150. Katiyar JC, Sen, AB. A new technique for rapid screening of potential nematocidal compounds. Indian J Pharm 1969; 31: 132-134
 151. Ho NFH, Sims SM, Vidmar TJ, Day JS, Barsuhn CL, Thomas EM, Geary TG, Thompson DP. Theoretical perspectives on anthelmintic drug discovery: interplay of transport kinetics, physicochemical properties, and *in vitro* activity of anthelmintic drugs. J Pharm. Sci 1994; 83: 1052-1059
 152. Conder GA, Johnson SS, Nowakowski DS, Blake TE, Dutton FE, Nelson SJ, Thomas EM, Davis J.P, Thompson DP. Anthelmintic profile of the cyclodepsipeptide PF1022A in *in vitro* and *in vivo* models. J Antibiot 1995; 48: 820-823
 153. Rapson EB, Jenkins DC, Chilwan AS. Improved detection of anthelmintic activity in an *in vitro* screen utilizing adult *Nippostrongylus brasiliensis*. Parasitol Res 1987; 73:190-191
 154. Alonso-Villalobos P, Martínez-Grueiro MM. The *in vitro* secretion of acetylcholinesterase by adult stages of *Heligmosomoides polygyrus*: the effects of broad-spectrum anthelmintics. J Vet Med B 2000; 47: 1-8
 155. Bottjer KP, Bone LW. *Trichostrongylus colubriformis*: effect of anthelmintic on ingestion and oviposition. Int J Parasitol 1985; 15: 501-503
 156. Jenkins DC, Carrington TS. An *in vitro* screening test for compounds active against the parenteral stages of *Trichinella spiralis*. Tropenmed Parasit 1981; 32: 31-34
 157. Gómez- Barrio A, Bolás-Fernández F, Martínez-Fernández AR. *Trichinella pseudospiralis* as a model for the *in vitro* screening of anthelmintics. Wiad Parazytol 1986; 3: 303-311
 158. Gómez-Barrio A, Bolás-Fernández F, Martínez-Fernández AR. Evaluación de un método diseñado para la utilización de *Trichinella* en el cribado farmacológico *in vitro*. Rev Ibér Parasitol 1986; 46: 311-315
 159. Herrero A, Ochoa C, Pérez C, Rodríguez-Caabeiro F, Jiménez A, De Armas C, Criado A, Font M. Anthelmintic activity of pyrazinothiadiazine dioxide derivatives. Arzneim Forsch 1993; 43: 163-166
 160. Navarrete-Vázquez G, Cedillo R, Hernández-Campos A, Yépez L, Hernández-Luis F, Valdez J, Morales R, Cortés R, Hernández M, Castillo R. Synthesis and antiparasitic activity of 2-(trifluoromethyl)-benzimidazole derivatives. Bioorg Med Chem. Lett 2001;11: 187-190